

天
净
沙
系
列

CAT#:130891-50

低温运输，

130891e、130891f -20℃保存

TIANDZ

动物线粒体总蛋白提取试剂盒

Animal Mitochondria Total Protein

Extraction Kit

使用手册 V1.3

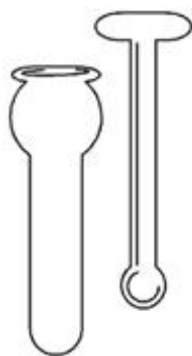
北京天恩泽基因科技有限公司

北京市海淀区上地信息路 26 号北京市留学人员海淀创业园中关村创业大厦 506

网址: www.tiandz.com; 电话: 400-6765278; 电邮: order@tiandz.com

<p>产品及特点</p>	<p>线粒体是非常重要的细胞器，它不但跟很多人类疾病相关，而且还是母系遗传研究的重要材料。本产品可用于动物细胞线粒体总蛋白的快速微量提取，可用于各种后续实验研究。它具有下列特点：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 即开即用，用户不需要自己配制各种溶液，优化各种条件。 2. 本试剂盒有粗提和精提两个操作选项，但是精提需要超速离心机。粗提所得线粒体可以直接用于蛋白分析（SDS-PAGE、Western Blot、ELISA 等）、蛋白组分析和线粒体 DNA 纯化。精提线粒体可以用于偶联分析和体外线粒体蛋白合成等实验。 3. 本产品一次可以处理约 2×10^8 个培养细胞，30 mg 培养细胞（相当于 15 瓶 150 mm 培养细胞）可以纯化到 0.5-1.5 mg 线粒体。 4. 本产品适用于各种动物悬浮培养细胞和贴壁培养细胞，不能用于动物实体组织。 5. 提供线粒体染液，可以在操作中随时监测纯化过程中线粒体的完整性。 6. 得到的总蛋白可以直接用于 SDS-PAGE、2D 电泳、免疫印迹分析、蛋白活性测定和 BCA 法及 Lowry 法蛋白定量（不适用于 Bradford 法）。 																											
<p>规格及成分</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th data-bbox="557 1016 967 1081">成份</th> <th data-bbox="967 1016 1168 1081">编号</th> <th data-bbox="1168 1016 1390 1081">大扁纸盒包装</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="557 1081 967 1146">动物线粒体纯化溶液 A</td> <td data-bbox="967 1081 1168 1146">130891a</td> <td data-bbox="1168 1081 1390 1146">50 mL</td> </tr> <tr> <td data-bbox="557 1146 967 1211">动物线粒体纯化溶液 B</td> <td data-bbox="967 1146 1168 1211">130891b</td> <td data-bbox="1168 1146 1390 1211">250 mL×2</td> </tr> <tr> <td data-bbox="557 1211 967 1276">蔗糖</td> <td data-bbox="967 1211 1168 1276">130891c</td> <td data-bbox="1168 1211 1390 1276">100 g (干粉瓶)</td> </tr> <tr> <td data-bbox="557 1276 967 1341">詹纳斯绿 B 染色液 (0.2%)</td> <td data-bbox="967 1276 1168 1341">130891d</td> <td data-bbox="1168 1276 1390 1341">1 mL (棕色管)</td> </tr> <tr> <td data-bbox="557 1341 967 1406">蛋白微量提取溶液 A</td> <td data-bbox="967 1341 1168 1406">130891e</td> <td data-bbox="1168 1341 1390 1406">15 mL</td> </tr> <tr> <td data-bbox="557 1406 967 1471">蛋白微量提取溶液 B</td> <td data-bbox="967 1406 1168 1471">130891f</td> <td data-bbox="1168 1406 1390 1471">1.5 mL</td> </tr> <tr> <td data-bbox="557 1471 967 1529">使用手册</td> <td data-bbox="967 1471 1168 1529">130891sc</td> <td data-bbox="1168 1471 1390 1529">1 份</td> </tr> </tbody> </table>				成份	编号	大扁纸盒包装	动物线粒体纯化溶液 A	130891a	50 mL	动物线粒体纯化溶液 B	130891b	250 mL×2	蔗糖	130891c	100 g (干粉瓶)	詹纳斯绿 B 染色液 (0.2%)	130891d	1 mL (棕色管)	蛋白微量提取溶液 A	130891e	15 mL	蛋白微量提取溶液 B	130891f	1.5 mL	使用手册	130891sc	1 份
成份	编号	大扁纸盒包装																										
动物线粒体纯化溶液 A	130891a	50 mL																										
动物线粒体纯化溶液 B	130891b	250 mL×2																										
蔗糖	130891c	100 g (干粉瓶)																										
詹纳斯绿 B 染色液 (0.2%)	130891d	1 mL (棕色管)																										
蛋白微量提取溶液 A	130891e	15 mL																										
蛋白微量提取溶液 B	130891f	1.5 mL																										
使用手册	130891sc	1 份																										
<p>运输及保存</p>	<p>低温运输，130891e、130891f-20℃保存，其余成分常温保存，保存期限一年。</p>																											
<p>自备试剂</p>	<p>PBS 缓冲液。</p>																											
<p>使用方法</p>	<p>注意：线粒体膜对温度高度敏感，所以整个操作必须在冰上或冷室进行，所要用的溶液和离心管都必须预先冷却，否则线粒体容易破裂。</p> <p>一：准备工作（此步骤同柱式动物线粒体 DNAout 中线粒体提取步骤）。未用完的下列溶液需要-20℃保存，否则容易长菌。下次使用前务必让沉淀溶解并摇晃均匀。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 将溶液 A 和溶液 B 放冰上预冷待用。 2. 配制 1.7M 高比重溶液（精提时需要配制此溶液，粗提时不需要配制此溶液）：36 克蔗糖用溶液 B 溶解并定溶到 60mL，冰上预冷待用。 																											

Dounce 匀浆器



Dounce

3. 配制 1.0M 低比重溶液。粗提时需要低比重溶液 100mL，配制方法是将 34 克蔗糖用溶液 B 溶解并定溶到 100mL，冰上预冷待用。精提时需要低比重溶液 150mL，配制方法是将 51 克蔗糖用溶液 B 溶解并定溶到 150mL，冰上预冷待用。

4. 配制线粒体重悬液。粗提时需要重悬液 200mL，配制方法是将 150 mL 溶液 B 和 50 mL 1.0M 低比重溶液混合；精提时需要重悬液 300mL，配制方法是将 225 mL 溶液 B 和 75 mL 1.0M 低比重溶液混合，即得 300mL 线粒体重悬液，冰上预冷待用。

二：线粒体粗提（此步骤同柱式动物线粒体 DNAout 中线粒体提取步骤）

5. 如果提取材料是单层细胞，先用 60 mL 自备的 PBS 缓冲液洗涤 2×10^8 个培养的单层细胞，共洗涤 2 次。然后用塑料刮匙刮下细胞，重悬在 60 mL PBS 缓冲液中。如果是悬浮细胞，则 1000g 4℃ 离心 10 分钟收集 2×10^8 个细胞，再用 60 mL PBS 缓冲液洗涤 2 次，最后将细胞重悬在 60 mL PBS 缓冲液中。

6. 用平甩转子（swinging-bucket rotor）离心机 1000 g 4℃ 离心 10 分钟，吸弃上清，保留细胞沉淀。

7. 加入 5 倍体积(以细胞沉淀的体积为基数)的预冷的溶液 A，轻柔重悬细胞。

8. 冰上放置 4-5 分钟。注意：冰浴时间不要超过 5 分钟。

9. 如果是成纤维细胞，由于其难以裂解，可将细胞重悬液在 -80℃ 放置 20-30 分钟后再化冻，然后进入下步操作。如果不是成纤维细胞，则直接进入下步操作。

10. 将细胞重悬液体转移到预冷的 Dounce 玻璃匀浆器中（工作体积为 10-15 mL，间隙为 0.12 mm，最好是玻璃材质，否则线粒体产率会降低）匀浆适当次数。细胞株不同，其最适匀浆次数不同，一般需要 40 次-60 次左右。匀浆是线粒体纯化最关键的步骤，故匀浆前最好先通过预实验确定最适匀浆次数，方法是每匀浆 5-10 次后，取 2-3 uL 匀浆液到载玻片上，然后在相差显微镜下观察，完整细胞数量降低到 20% 以下为佳。

11. 加入 1/3 体积的、预冷的 1.0 M 低比重溶液，轻柔混匀。

12. 用平甩转子离心机 4℃ 1000 g 离心 10 分钟。沉淀含残留完整细胞、细胞碎片和细胞核，上清液含线粒体。

13. 转移上清液到离心管中，冰上放置。在显微镜下检测上清液中线粒体的完整性。具体做法是先滴 50uL 左右上清液到载玻片上，再滴入 50 uL 詹纳斯染液绿 B 染色液 20 分钟，油镜下观察，蓝绿色颗粒状物即为线粒体。

14. 用固定角度转子（fixed-angle rotor）离心机 4℃ 15000 g 离心 15 分钟，弃上

清，所得棕黑色沉淀即为粗提线粒体沉淀。

15. 用 10 mL 线粒体重悬液重悬线粒体，4℃ 15000 g 离心 15 分钟，弃上清。
16. 重复上步一次。
17. 最后用适量的线粒体重悬液重悬线粒体，可用于各种后续实验（本试剂盒不提供相关试剂），如果用于下面的精提操作，则用 10mL 线粒体重悬液重悬。

三：线粒体精提（需要超速离心机）

18. 在跟超速离心机匹配的 50 mL 的离心管中，加入 10 mL 预冷的高比重溶液，再在上面加上 10 mL 预冷的低比重溶液，最后再加上 10 mL 线粒体粗提液。
19. 70000g 4℃离心 40 分钟，线粒体将位于高比重溶液和低比重溶液之间区域。
20. 小心用广口吸管吸出线粒体到新的离心管中，加入等体积的线粒体重悬液。
21. 用平甩转子（swinging-bucket rotor）离心机 1000 g 4℃离心 10 分钟，吸弃上清，保留线粒体沉淀。
22. 用 10 mL 线粒体重悬液重悬线粒体，在平甩转子离心机上 4℃ 1000 g 离心 10 分钟，吸弃上清，保留线粒体沉淀。
23. 再重复上步一次。
24. 最后用适量线粒体重悬液重悬线粒体，得到线粒体精提液。可以直接用于 Lowry 法蛋白浓度测定，也可以用于其他后续实验。

四：总蛋白提取

25. 每 10mg 湿重线粒体沉淀加入 0.5 mL 蛋白微量提取溶液 A 和 50 uL 蛋白微量提取溶液 B，吹打混匀。
26. 冰上放置 30 分钟至 1 小时至溶液变清。
27. 4℃ 12,000 g 离心 1 分钟。
28. 将上清液转移至一新的 1.5 mL 塑料离心管中即得到蛋白溶液，可置于-70℃冰箱保存或立即使用。如果要进行 SDS-PAGE 电泳，可取部分样品到离心管中，加入 5×SDS-PAGE 上样缓冲液（终浓度为 1×），在沸水中处理 5 分钟后立即上样电泳。

关联产品

植物线粒体纯化试剂盒（CAT#:111207）。